Lane Medical Library

Aus der chemischen Abteilung (Leiter: Prof. Dr. Hinsberg) des pathologischen Institutes der Charité zu Berlin
Direktor: Prof. Dr. R. Rössle

STANFORD UNIVERSITY
JUL
6
1938
LIBRARY

„Die Abhängigkeit der Ninhydrinreaktion von der Wasserstoffionenkonzentration".

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der

Medizinischen Doktorwürde

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Berlin

vorgelegt von

Kurt Steller

aus Berlin.

Tag der Promotion: 10. April 1937

Berlin

Wilhelm Gotthof, Berlin-Steglitz, Schöneberger Straße 4

M 31

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Siebeck

Referent: Prof. Dr. Hinsberg

Korreferent: Prof. Dr. Rössle

Wird einem Tier parenteral Eiweiß zugeführt, so kommt es im Organismus des betreffenden Tieres zum Auftreten von Fermenten, die imstande sind, das zugeführte Eiweiß abzubauen. Diese Fermente werden durch die Niere ausgeschieden, erscheinen im Harn und können hier durch die Abderhalden'sche Reaktion nachgewiesen werden. Das Prinzip dieser Reaktion ist, die Fermente aus dem Urin zu isolieren und sie so anzureichern, daß sie imstande sind, das Eiweiß, auf das sie spezifisch eingestellt sind, in einem solchem Maße abzubauen, sodaß dieser Abbau irgendwie chemisch erfaßbar ist. Die Methode der Abderhalden'schen Reaktion sei im Folgenden kurz geschildert:

Eine bestimmte Menge gegen Lackmuspapier neutralisierten Harnes, meist 20 ccm, des behandelten Tieres wird in Zentrifugengläschen gefüllt und mit der gleichen Menge Aceton versetzt. Der sich bildende Niederschlag wird abzentrifugiert und das überstehende Harn-Aceton-Gemisch abgegossen. In diesem Niederschlag finden sich die Fermente. Dann werden die Zentrifugengläser mit der Oeffnung nach unten auf Filtrierpapier gesetzt, bis alle an ihren Wänden haftende Flüssigkeit abgelaufen ist. Sie werden dann unter Vermeidung der Berührung des Zentrifugates noch mit Filtrierpapierstreifen gründlich ausgerieben, um die jetzt noch an ihren Wänden haftenden Flüssigkeitsteilchen möglichst vollständig zu entfernen. Das so zubereitete Zentrifugat wird mit einer bestimmten, den Bedürfnissen jeweils anzupassenden Menge physiologischer Kochsalzlösung versetzt und darin zu einer Suspension verrieben. Es werden nun von dem auf seinen Fermentgehalt zu untersuchenden Harn zwei oder drei Kochsalzaufschwemmungen dieser Art hergestellt. Zu einer der so hergestellten Suspensionen wird nun dasjenige Eiweiß hinzugesetzt, dessen Abbau durch das Vorhandensein von spezifisch gegen es eingestellten Fermenten erwartet wird. Es ist dieses der Hauptversuch; die andere oder die anderen beiden Kochsalzsuspensionen dienen als Kontrollen. Diese zwei oder drei Zentrifugengläschen mit ihren Kochsalzaufschwemmungen kommen dann für etwa 16 Stunden in einen Brutschrank. Nach der Bebrütung wird von jedem der Gläser eine bestimmte Menge Flüssigkeit entnommen, in gleich weite Reagenzgläser von Jenaer Glas gegeben und dann peinlich genau eine Minute lang gleichmäßig erhitzt. Dieses exakte, gleichmäßige, gleich lange Erhitzen ist eine wichtige Forderung für ein einwandfreies, richtiges Versuchsergebnis.

Ninhydrin gibt nämlich mit gewissen Molekülgruppen, wahrscheinlich handelt es sich um NH_2-Gruppen eine Blaufärbung. Mit Ninhydrin färbbare Substanzen sind nun in jedem Harn vorhanden, vermehren sich aber, wenn Eiweiß abgebaut wird. Auch das nach den üblichen Methoden hergestellte Eiweißpulver, das zur Prüfung auf seinen Abbau Verwendung

findet, enthält immer mit Ninhydrin reagierende Substanzen. Diese lassen sich aber sicher durch mehrmaliges Kochen mit Wasser und nachfolgendes Abgießen vom Kochwasser entfernen, so daß daraus keine Schwierigkeiten entstehen.

Sind nun in einem Harn Fermente, die das zugeführte Eiweiß abzubauen vermögen, so wird dasjenige Reagenzglas, das dem Hauptversuch entnommene Flüssigkeit enthält, eine stärkere Blaufärbung nach dem Erhitzen mit Ninhydrin zeigen als das mit der dem Kontrollversuch entnommenen Flüssigkeit. Der Ausfall der Reaktion ist positiv. Sind keine entsprechenden Fermente im Harn des Versuchstieres vorhanden, so zeigen Haupt- und Kontrollversuch die gleiche oder die Kontrolle eine etwas stärkere Farbe als der Hauptversuch. Es hat kein Eiweißabbau stattgefunden, die Bedingungen für den Ausfall der Ninhydrin-Reaktion sind in Haupt- und Kontrollversuchen die gleichen, das Ergebnis ist negativ.

Das schwierige, gleichmäßige Erhitzen der Reagenzgläser gab in den Händen darin Ungeübter leicht Fehlresultate, und es wurde daher nach einer Aenderung der Methode gesucht, die diese mögliche Fehlerquelle beseitigte. Vor kurzem ist von Abderhalden eine Modifikation seiner Ninhydrinreaktion angegeben worden, die das Kochen von Hand ersetzt durch ein Erhitzen von 100 Grad in einem Brutschrank, der so eingerichtet ist, daß er ein gleichmäßiges Erwärmen in seinem Inneren gewährleistet. Dieses Ausschalten des Kochens von Hand und seine Ersetzung durch ein Erhitzen im Brutschrank brachte gewisse methodische Aenderungen mit, die zu schildern aber überflüssig ist, da sie das Wesen der Abderhaldenschen Reaktion unbeeinflußt lassen. Es handelt sich nach wie vor um den Vergleich von Farbintensität zwischen Haupt- und Kontrollversuch; das Ergebnis ist positiv, wenn der Hauptversuch stärker gefärbt ist, sonst negativ.

Eine weitere Forderung für den Nachweis von Fermenten, die in einem Organismus durch parenterale Zufuhr von Eiweiß entstehen, ist die, daß der auf seinen Fermentgehalt zu untersuchende Harn nicht schon vor der Eiweißinjektion Stoffe enthält, die imstande sind, das noch gar nicht gespritzte Eiweiß abzubauen. Diese Stoffe könnten dem Organismus sonst nicht eigene, durch die Eiweißinjektion bedingte Fermente vortäuschen. Es muß deshalb 14 Tage vor der Eiweißinjektion der Harn des Versuchstieres täglich auf seine Unfähigkeit, das zu spritzende Eiweiß abzubauen, untersucht werden; erst dann darf der Hauptversuch angeschlossen werden. Wird auch nur einmal in diesem Vorversuch das Eiweiß abgebaut, so ist das Versuchstier vom Hauptversuch auszuschließen.

Die Möglichkeit, spezifisch gegen bestimmtes Eiweiß eingestellte Fermente aus dem tierischen Organismus isolieren zu können, hat eine ungeheure Bedeutung. Man ist dadurch imstande, Eiweiß, das nicht voneinander unterschieden werden kann, durch physiologische Reaktion sicher voneinander zu trennen. Denn es ist ja bekannt, daß Fermente eine sehr große Spezifität besitzen und daß schon geringe Aenderungen in der Struktur eines Körpers genügen, um bei Anwesenheit eines bestimmten Fermentes einen Ab- oder Aufbau hervorzurufen.

Der Ausbau der Abderhalden'schen Reaktion hat ein Arbeitsfeld von großer Weite eröffnet. Man hat im physiologischen Institut in Halle, aus-

gehend von der Tatsache, daß jedes parenteral zugeführte Eiweiß in einem Organismus Fermentvorgänge hervorruft, welche diesem körperfremden Stoff durch Abbau seine Artspezifität nehmen, zum Beispiel versucht, eine Frühdiagnostik der Schwangerschaft zu ermöglichen. Hierbei ist das artfremde Eiweiß kindliches Placentargewebe. Dieses gelangt zum Teil in die Blutbahn der Mutter, regt im mütterlichen Organismus die Produktion von Fermenten an, welche das Placentar-Eiweiß — und nur Placentar-Eiweiß — abzubauen imstande sind. Diese Fermente erscheinen im Urin der Graviden, werden dort isoliert, es wird ihnen Placentar-Eiweiß zugesetzt, und dessen Abbau ist — wie bereits angeführt — durch den positiven Ausfall der Ninhydrin-Reaktion erfaßbar. Es soll — wie mitgeteilt wird — die Frühdiagnostik der Schwangerschaft auf diese Weise absolut sicher sein. Nur im xten Monat soll es manchmal zum negativen Ausfall der Reaktion kommen.

Es ist weiter eine Diagnose bösartiger Geschwülste versucht worden. Der Gedanke hierbei ist derselbe wie der bei dem Schwangerschaftsnachweis. Geschwulstgewebe, z. B. Carcinom-Zellen gelangen in die Blutbahn des Trägers, erregen Produktion von Fermenten, die das Carcinom-Gewebe abbauen, diese Fermente können aus dem Urin des Trägers isoliert werden und durch ihre Fähigkeit auch im Reagenzglas unter geeigneten Bedingungen Carcinom-Gewebe abzubauen, nachgewiesen werden.

In neuerer Zeit ist es auch gelungen, bei verwandten Tiergruppen mit Hilfe der Ninhydrin-Reaktion Verwandtschaft in der Art des Eiweißes nachzuweisen. Ebenso gelang es, Eiweiß von jungen Tieren vom Eiweiß alternder auf diese Weise zu trennen, so daß man daraus auf eine morphologische Altersverschiedenheit des Eiweißes schloß. Es wurden z. B. bei parenteraler Zufuhr von Lebereiweiß eines drei Monate alten Tieres in einem tierischen Organismus — als Versuchstiere dienten Kaninchen — Fermente gebildet, die nur dieses Eiweiß abzubauen imstande waren, und nicht etwa Lebereiweiß eines z. B. 6 Monate alten Tieres vom gleichen Wurf.

Bei einer Arbeit mit der modifizierten Abderhalden'schen Methode zum Nachweis von Abwehrfermenten fiel auf, daß die Reaktion von Substanzen mit Ninhydrin in hohem Grade von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig ist.

Dieser Befund ließ den Gedanken auftauchen, daß es möglich sei, durch den Ausfall der Reaktion Resultate zu erzielen, die einen Eiweißabbau wahrscheinlich machen, die aber evtl. nur durch die Verschiedenheit der Wasserstoffionenkonzentration im Kontroll- und Hauptversuch bedingt sind. Denn, streng genommen, arbeitet man ja im Kontroll- und Hauptversuch gar nicht unter denselben Bedingungen. Man gibt zum Hauptversuch ein Substrat, Eiweiß, hinzu, von dem man gar nicht weiß, ob es die Ph-Werte unbeeinflußt läßt oder verändert.

Die Fragestellung, die sich durch den Befund einer Abhängigkeit der Reaktion eines Stoffes mit Ninhydrin von der Wasserstoffionenkonzentration ergibt, ist folgende:

1. Ist eine Abhängigkeit der Ninhydrinreaktion vom Ph in einem solchen Grade vorhanden, daß selbst kleine Ph-Schwankungen schon einen beträchtlichen Reaktionsunterschied ergeben?

2. Läßt sich bei Bejahung der ersten Frage bei einem mit Eiweiß nicht vorbehandelten Tier, bei dem sich im Harn eine positive Ninhydrinreaktion findet, ein Ph-Unterschied zwischen Kontroll- und Hauptversuch ermitteln, der diesen positiven Ausfall der Reaktion erklären könnte?

Frage 1:

Die Wasserstoffionenkonzentration kann die Ninhydrinreaktion in verschiedener Weise beeinflussen:

a) Der Ablauf der Reaktion kann sich ändern.

b) Der Beginn der Reaktion kann sich ändern.

c) Ablauf und Beginn können sich ändern.

Versetzt man vier gleiche Glasröhrchen, wie sie in der Modifikation der Ninhydrinreaktion zum Versuch gebraucht werden, je mit 0,1 ccm Ninhydrin und mit 0,5 ccm einer Glykokoll-Lösung bestimmter Wasserstoffionenkonzentration, setzt sie dann in einen Brutschrank, der sie auf 100 Grad erhitzt, und nimmt das erste Röhrchen bei Erreichen der vollen Minute nach Farbbeginn, das zweite eine Minute später als das erste, das dritte zwei Minuten später als das zweite und das vierte drei Minuten später als das dritte heraus, so hat man vier Röhrchen mit steigender Intensität an Blaufärbung. Zum Nachweis, in welcher Weise die Intensität der Blaufärbung von der Dauer der Versuchszeit abhängig ist, kann man folgendermaßen verfahren:

Man füllt aus jedem der Gläschen nach völliger Abkühlung je 0,1 ccm in lange schmale Glasröhren von der gleichen Weite, verdünnt das erste Glas aus einer Bürette mit Wasser bis zu einer mattblauen Farbe und verdünnt dann jedes der folgenden Gläser, bis sie dieselbe Blaufärbung wie das erste Glas haben. Man kann nun an der für jedes Glas verbrauchten Flüssigkeitsmenge die Intensität der Blaufärbung eines jeden Röhrchens abschätzen. Beim Eintragen in ein Koordinatensystem, bei dem auf der Horizontalen die Erhitzungszeiten, auf der Vertikalen die verbrauchten Flüssigkeitsmengen anzugeben sind, kann nun festgestellt werden, in welcher Weise die Intensität der Blaufärbung von der Dauer der Erhitzungszeit abhängig ist. Die Verbindungslinie der in das Koordinatensystem eingezeichneten Punkte ergab stets eine gerade Linie und zeigt damit an, daß die Intensität der Blaufärbung bei der Ninhydrinreaktion direkt proportional der Erhitzungszeit ist. Der Winkel, den nun diese Gerade mit der Horizontalen bildet, zeigt die Schnelligkeit an, mit der die Blaufärbung bei fortschreitender Erhitzungszeit vor sich geht. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Horizontalen zeigt den Beginn der Blaufärbung an.

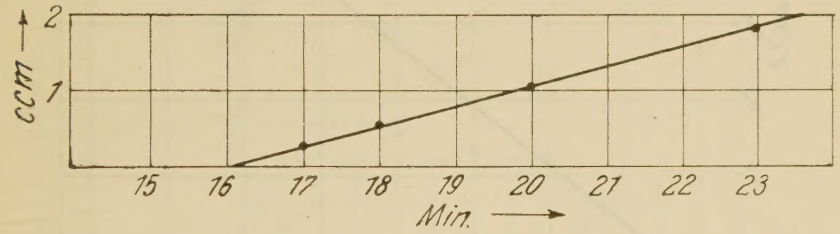
Macht man diese Versuche mit Glykokoll-Lösungen von verschiedenem Ph, und bringt man die Flüssigkeiten, wie oben angegeben, durch entsprechende Verdünnungen alle auf denselben Farbwert, so daß die Ergebnisse auch untereinander vergleichbar sind, so zeigt sich in jeder Versuchsreihe eine völlige Proportionalität der Blaufärbung mit der Erhitzungszeit, d. h. man erhält beim Eintragen der zur Erzielung der Farbgleichheit verbrauchten Flüssigkeitsmengen in ein Koordinatensystem stets gerade Linien. Die Winkel aber, welche diese Geraden mit der Horizontalen bilden, wechseln jeweils mit der Aenderung der Ph-Werte der verbrauchten Lösung, und zwar werden sie größer mit der Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration der gleich konzentrierten Glykokoll-Lösungen.

Als Beispiel diene der folgende Versuch:

I. 0,01%ige Glykokoll-Lösung mit einem Ph von 4,76

Erhitzungszeit	Verbrauchte Flüssigkeit in ccm
17 Min.	0,24 ccm
18 „	0,51 ccm
20 „	1,05 ccm
23 „	1,80 ccm

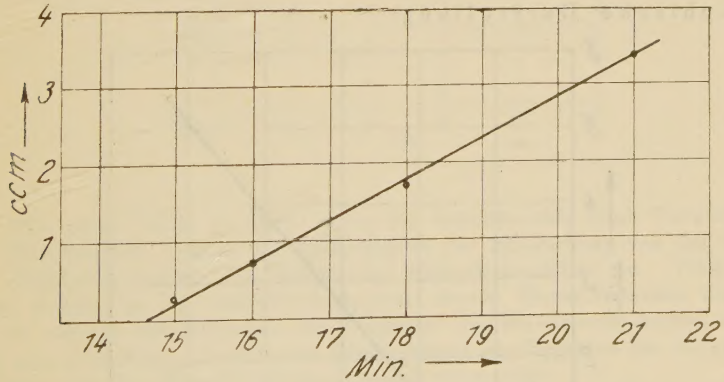
Graphische Darstellung:



II. 0,01%ige Glykokoll-Lösung mit einem Ph von 5,50

Erhitzungszeit	Verbrauchte Flüssigkeit in ccm
15 Min.	0,24 ccm
16 „	0,70 ccm
18 „	1,70 ccm
21 „	3,40 ccm

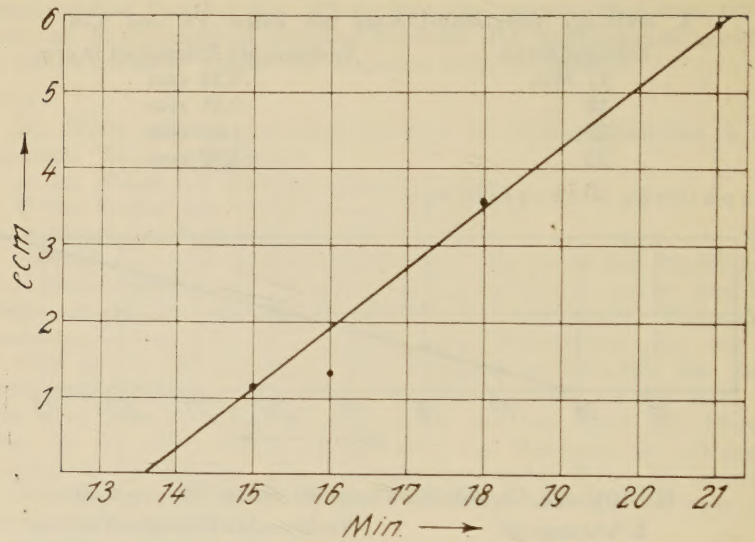
Graphische Darstellung:



III. 0,01%ige Glykokoll-Lösung mit einem Ph von 6,32

Erhitzungszeit	Verbrauchte Flüssigkeit in ccm
15 Min.	1,12 ccm
16 „	1,30 ccm
18 „	3,56 ccm
21 „	5,87 ccm

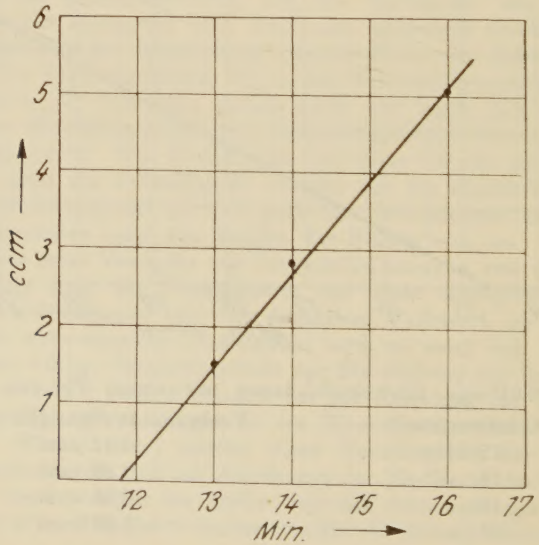
Graphische Darstellung:



IV. 0,01%ige Glykokoll-Lösung mit einem Ph von 7,65

Erhitzungszeit	Verbrauchte Flüssigkeit in ccm
13 Min.	1,51 ccm
14 „	2,82 ccm
16 „	5,16 ccm

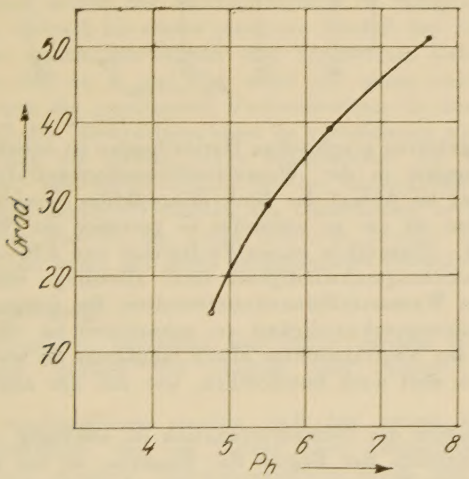
Graphische Darstellung:



Mißt man die Winkel, welche diese Geraden mit der Horizontalen bilden und trägt die Winkelmaße in ein Koordinatensystem ein, dessen Horizontale die Ph-Werte, dessen Vertikale die Winkelgrade angibt, so kommt man zu einer Kurve, welche die Schnelligkeit im Ablauf der Nynhydrinreaktion bei Wechsel der Wasserstoffionenkonzentration zeigt.

Ph	Winkel in Grad
4,76	16
5,50	29
6,32	39
7,65	51

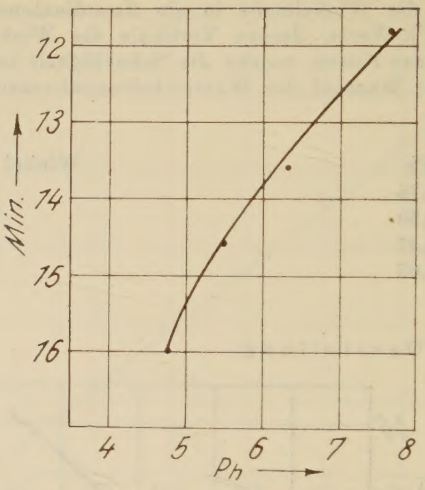
Graphische Darstellung:



Wie schon früher erwähnt, geben die Schnittpunkte jener Geraden mit der Horizontalen, welche die Abhängigkeit der Blaufärbung von der Dauer der Erhitzung zeigen, den Beginn der Ninhydrinreaktion an. Trägt man diese Punkte in ein Koordinatensystem, dessen Horizontalachse die Ph-Werte, dessen Vertikalachse den Zeitpunkt der Blaufärbung angibt, so erhält man eine Kurve, welche die Abhängigkeit des Beginnes der Ninhydrinreaktion von der Wasserstoffionenkonzentration zeigt.

Min.	Ph
16	4,76
14,6	5,50
13,6	6,32
11,8	7,65

Graphische Darstellung:



Aus den beigefügten graphischen Darstellungen ist ersichtlich, daß schon geringe Aenderungen in der Wasserstoffionenkonzentration eine erhebliche Veränderung im Ablauf der Ninhydrinreaktion veranlassen. Der Ablauf der Reaktion ist um so schneller je geringer die Wasserstoffionenkonzentration ist. (Geprüft in einem Ph-Bereich von 4,76—7,65.) Die Aenderung der Reaktionsgeschwindigkeit läuft allerdings nicht proportional der Abnahme der Wasserstoffionenkonzentration. Bei steigenden Ph-Werten nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit am schnellsten im alkalischen Gebiet zu, um jenseits des Neutralpunktes etwas langsamer zu werden. Immerhin ist sie aber auch dort noch beträchtlich, wie aus der abgebildeten Kurve ersichtlich ist.

Auch der Beginn der Ninhydrinreaktion ist abhängig von der Wasserstoffionenkonzentration, der Beginn der Reaktion ist um so früher, je geringer die Wasserstoffionenkonzentration ist. Auch hier ist die Aenderung größer im sauren Gebiet als jenseits des Neutralpunktes, ist aber auch dort noch beträchtlich.

Die Beantwortung der

Frage 1

ist mithin folgende:

Beginn und Ablauf der Ninhydrinreaktion ist abhängig von der Wasserstoffionenkonzentration. Die Art der Aenderung ist aus den graphischen Darstellungen ersichtlich.

Frage 2:

Zur Beantwortung der zweiten Frage wurde folgende Versuchsanordnung gemacht. Es fand Kaninchenharn Verwendung, und zwar Harn eines gesunden, unbehandelten Kaninchens, der die Fähigkeit besaß, ein bestimmtes menschliches Lebereiweißpulver abzubauen.

Es wurden vier Versuche angesetzt, von denen drei gepuffert waren; als Pufferungsgemisch diente Phosphatpuffer. Es hatten Kontroll- und Hauptversuch in der ersten Versuchsreihe einen Ph von 7,06, in der zweiten von 7,60, in der dritten von 6,46; die vierte Versuchsreihe war ungepuffert. Als Substrat für den Hauptversuch in jeder Versuchsreihe fand das gleiche menschliche Lebereiweiß Verwendung. Es war vorher genau auf die Abwesenheit von mit Ninhydrin reagierenden Substanzen untersucht worden.

Nach 16stündiger Bebrütung wurden alle vier Versuchsreihen zu gleicher Zeit im Wärmofen erhitzt; es fand sich folgendes Ergebnis:

Die drei gepufferten Versuche zeigten sämtlich einen negativen Ausfall der Ninhydrinreaktion, der ungepufferte Versuch zeigte einen schwach positiven Ausfall. Bei Messung des Ph im letzten Versuch hatte die Kontrolle einen Ph von 7,69, der Hauptversuch einen Ph von 7,91. Der Hauptversuch war etwas alkalischer als der Kontrollversuch. Der Beginn der Ninhydrinreaktion mußte im Hauptversuch eher einsetzen als im Kontrollversuch, außerdem mußte der Reaktionsablauf im Hauptversuch schneller sein. Es mußte dadurch zu einem positiven Ausfall der Ninhydrinreaktion kommen, und es wurde ein Abbau des zugesetzten Lebereiweißes vorgetäuscht; denn daß es in der Tat nicht zu einem solchen Abbau gekommen ist, zeigen die gepufferten Versuchsreihen, in denen sämtlich ein negativer Ausfall der Ninhydrinreaktion zu verzeichnen war.

Damit ist auch die zweite Frage beantwortet: Es ist möglich, daß zwischen Kontroll- und Hauptversuch bei der Abderhalden'schen Reaktion zum Nachweis von Abwehrfermenten ein Unterschied in der Wasserstoffionenkonzentration auftritt, der einen positiven Ausfall der Reaktion zur Folge hat und dann einen gar nicht stattgehabten Eiweißabbau vortäuscht.

Zusammenfassung:

Es ist in Versuchen bewiesen, daß schon geringe Ph-Veränderungen einen merklichen Einfluß auf Beginn und Ablauf der Ninhydrinreaktion haben.

Es konnte nachgewiesen werden, daß bei einem Harn eines unbehandelten Kaninchens, der bei Zusatz eines bestimmten menschlichen Lebereiweißes eine positive Ninhydrinreaktion ergab, ein Ph-Unterschied zwischen Kontroll- und Hauptversuch aufgetreten war, und daß bei drei parallel laufenden gepufferten Versuchsreihen die Ninhydrinreaktion negativ ausfiel.

Es erscheint deshalb erforderlich, um ein einwandfreies Versuchsergebnis mit der Abderhalden'schen Reaktion zu erzielen, Kontroll- und Hauptversuch zu puffern.

Für die freundliche Unterstützung bei meiner Arbeit im pathologischen Institut sage ich Herrn Professor Dr. Rössle und Herrn Dr. Ammon meinen besonderen Dank.

Literatur.

W. Stoeckel: Lehrbuch der Geburtshilfe. 3. Aufl. 1930, Jena, Seite 142.

Emil Abderhalden: Methoden des Nachweises von Abwehrfermentwirkungen. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 2, 1933, Seite 2089—2158.

Emil Abderhalden und Severian Buadze: Studien über Altersveränderungen von Blut- und Organeiweißstoffen mittels der Abwehrfermentreaktion. Fermentforschung Bd. 14, Heft 3 (1934).

Lebenslauf.

Am 6. August 1911 wurde ich, Kurt Walter Paul Steller, in Berlin-Lichterfelde geboren. Von 1918—1930 besuchte ich das Realgymnasium zu Berlin-Lichterfelde und machte Ostern 1930 dort mein Abitur.

Von 1930–1935 studierte ich Medizin an der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin, machte im November 1932 die ärztliche Vorprüfung und nach Beendigung des Studiums im November 1935 das Staatsexamen.

Während des praktischen Jahres war ich vom 9. Dezember 1935 bis 29. Februar 1936 an der Kinderklinik der Charité zu Berlin, vom 1. bis 31. März 1936 auf der chemischen Abteilung des pathologischen Institutes der Charité zu Berlin und vom 1. April bis 9. Dezember 1936 auf der Inneren und Nerven-Abteilung der Krankenanstalt zu Bautzen tätig.